

Bactéria cromogênica associada a manchas negras

Black-spotted chromogenic bacteria

Maiquiele Boeira da Silva(1); Alexandra Flávia Gazzoni(2); Guilherme Gaboardi(3); Elias da Rosa Hoffmann(4); Daniel Galafassi(5)

1 Cirurgiã Dentista pela FSG Centro Universitário, Caxias do Sul, RS, Brasil.

E-mail: maiquiboeira@hotmail.com | ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0171-83322>

2 PhD em microbiologia, Caxias do Sul, RS, Brasil.

E-mail: alexandra.gazzoni@fsg.edu.br | ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5023-8653>

3 Biomédico pela FSG Centro Universitário, Caxias do Sul, RS, Brasil.

E-mail: gui_gaboardi@hotmail.com | ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8427-0785>

4 Biomédico pela Universidade Feevale, Caxias do Sul, RS, Brasil.

E-mail: elias.hoffmann@fsg.edu.br | ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5095-4716>

5 Docente e Doutor em Dentística do Curso de Odontologia da FSG Centro Universitário, Caxias do Sul, RS, Brasil.

E-mail: daniel.galafassi@fsg.edu.br | ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6738-4008>

Journal of Oral Investigations, Passo Fundo, vol. 9, n. 2, p. 33-42, julho-dezembro, 2020 - ISSN 2238-510X

[Recebido: novembro 28, 2019; Aceito: maio 9, 2020; Publicado: agosto 23, 20212]

DOI: <https://doi.org/10.18256/2238-510X.2020.v9i2.3752>

Endereço correspondente / Correspondence address

Daniel Galafassi

Curso de Odontologia, Centro Universitário da Serra
Gaúcha (FSG)

Rua Os Dezoito do Forte, 2366. Bairro São Pelegrino.
Caxias do Sul, RS, Brasil. CEP: 95020-472.

Sistema de Avaliação: *Double Blind Review*

Editor-chefe: Aloísio Oro Spazzin

Como citar este artigo / How to cite item: [clique aqui!/click here!](#)

Resumo

Objetivos: Este trabalho tem como objetivo avaliar a associação das bactérias *Prevotella Melaninogênica* e *Actinomyces* ao biofilme escuro em dentes permanentes. **Relato de Caso:** Um paciente apresentou manchas enegrecidas ao longo do contorno cervical dos dentes foi convidado a participar do presente estudo. Foi coletado com o auxílio de uma cureta estéril, uma parte deste biofilme que transferido para um eppendorff contendo soro fisiológico. O material coletado foi agitado em um Vórtex por 15 segundos e em seguida, inoculadas em 100 microlitros (µl) da solução em um meio de ágar sangue suplementado com Canamicina 5%, seguido de cultivo por 72 horas. A partir do crescimento bacteriano, as mesmas foram isoladas em ágar macconkey, chocolate e sangue em anaerobiose. Em seguida foram realizados testes de bioquimismo, utilizando-se os meios MIO (motilidade, indol e ornitina), citrato, TSI (triplo açúcar com ferro) e LIA (ágar lisina com ferro). **Conclusão:** Através das características clínicas associadas ao bioquimismo empregado nos testes, podemos concluir que a bactéria que está associada as manchas negras presentes no paciente é do gênero *prevotella spp*.

Palavras-chaves: *Prevotella melaninogenica*; *Actinomyses*; Bacteria; Manchas; Cromogênica.

Abstract

Objectives: This study aims to evaluate the association of *Prevotella Melaninogenic* and *Actinomyces* bacteria with dark biofilm in permanent teeth. **Case Report:** A patient with black spots along the cervical contour of the teeth was invited to participate in the present study. After its clarification and acceptance, completing the IC, was collected with the aid of a sterile curette, a part of this biofilm that was inserted into an eppendorff containing saline. The collected material was vortexed for 15 seconds and then inoculated into 100 microliters (µl) of the solution in a 5% kanamycin supplemented blood agar medium, followed by cultivation for 72 hours. From bacterial growth, they were isolated on macconkey agar, chocolate and anaerobic blood. Biochemical tests were then performed using MIO (motility, indole and ornithine), citrate, TSI (triple sugar with iron) and LIA (iron lysine agar) media. **Conclusion:** Through the clinical characteristics associated with the biochemism employed in the tests, we can conclude that the bacteria that is associated with black spots present in the patient is of the genus *prevotella spp*.

Keywords: *Melaninogenic Prevotella*; *Actinomyses*; Bacterium; Stains; Chromogenic.

Introdução

A cavidade bucal possui o mais complexo sistema de crescimento aberto das microbiotas e o maior reservatório de microrganismos, favorecendo contaminações e proliferação de bactérias (1). Os microrganismos presentes na cavidade bucal estabelecem adesão ou permanência em sulcos, fissuras ou espaços interproximais dos dentes (2). O corpo humano tem uma estimativa de 10 trilhões de células que trabalham de maneira integrada (3). O número de células procariontes chega a ser 10 vezes maior que a quantidade de células do organismo humano, ou seja, 97% desses organismos são benéficos e os outros 3% causam doenças (4). Sendo concentrado em maiores quantidades na boca e no intestino, considerando a boca o local de maior aglomeração desses seres (5).

A microbiota oral é um composto de diversos microrganismos, que em sua grande maioria não são comensais, ou seja, não prejudicam o organismo hospedeiro (4). Dentre os microrganismos, existem diversas espécies de bactérias, arqueas, fungos, vírus e protozoários, esses seres são capazes de prevenir a colonização na cavidade oral, de outros microrganismos patógenos (3).

A mancha negra consiste em uma microbiota diferente da do biofilme dental, apresentando uma estrutura relativamente estável, com porcentagem de 90% de bastonetes gram-positivos, em geral, os *Actinomyces* (6). Apesar de gram-negativa, a *Prevotella melaninogênica* é encontrada em pequena porcentagem (1%), porém sendo um dos principais agentes causais desses manchamentos (7).

As alterações de cor na dentadura decídua ou permanente, são comuns nos consultórios odontológicos, podem ser associados a fatores clínicos ou estéticos (8). As manchas dentárias estão divididas em dois tipos de descoloração: intrínseca, que é causada por fatores congênitos, sistêmicos ou genéticos; já a extrínseca está associada à presença de bactérias cromogênicas no biofilme dentário, alimentos pigmentados ou utilização de agentes (9).

A maioria dos indivíduos portadores de pigmentações negras extrínsecas nos dentes, possuem uma microflora de placa constituída por bactérias cromógenas que são *Prevotella melaninogênica* e *Actinomyces* (9). As manchas negras são apresentadas com uma linha contínua ou não, localizadas ao longo da margem gengival, podendo ser em pontos escuros ou formando uma linha paralela à margem, onde pode atingir no mínimo dois dentes. As pigmentações negras também podem estar impregnadas em sulcos, fôssulas e fissuras, porém são locais de mais difícil remoção (10), sendo assim, somente o uso de escova de dentes e dentífrico, não são capazes de eliminar a mancha negra, necessitando a intervenção profissional com raspagem e polimento com substâncias abrasivas como pastas profiláticas ou o uso de jato de bicarbonato de sódio (6). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação das bactérias *Prevotella Melaninogênica* e *Actinomyces* ao biofilme escuro em dentes permanentes.

Relato do caso

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP FSG) sob número de parecer 3.612.174 e preenchimento do TCLE pelo paciente, foram iniciados os procedimentos na clínica de Odontologia do Centro Universitário da Serra Gaúcha. Paciente do gênero masculino, 52 anos de idade, leucoderma, em bom estado de saúde geral e bucal procurou atendimento na Clínica de Triagem do Curso de Odontologia do Centro Universitário da Serra Gaúcha (FSG) para fins restauradores e instalação de implantes dentários e desejava informação sobre a pigmentação nos dentes. Após a realização do exame clínico, foi constatado que o mesmo havia manchas negras na região cervical molares superiores e inferiores, o que tudo indicava ser bactéria cromogênica (figura 1 e 2). Foi proposto ao paciente a análise microbiológica das manchas.

Figura 1. Indica as bactérias cromogênicas na cervical dos molares superiores do lado esquerdo



Figura 2. Indica as bactérias cromogênicas na cervical dos molares superiores do lado direito



Foram realizadas fotografias intra bucais das manchas negras (figura 1 e 2). Após as amostras foram coletadas da região cervical dos molares superiores com uma cureta de Gracey (Golgran, São Caetano do Sul, Brasil), devidamente estéril, a qual foi raspada da superfície dentária previamente selecionada durante 20 segundos em cinco movimentos de vai e volta de forma que tivesse o mínimo contato com oxigênio. O material coletado foi submerso no interior de um microtubo de Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), o qual continha 1ml de soro fisiológico estéril e mantidos em Jarra de anaerobiose (Permutation, JA0400).

O soro juntamente com o material coletado foi agitado em um Vórtex (Didática SP, 38266) por 15 segundos, a fim de obter-se uma solução homogeneizada de bactérias. Em seguida foram inoculadas 100 microlitros (µl) da solução em um meio de ágar sangue (Kasvi, Padova, Itália) suplementado com Canamicina 5% (KanaPlex, Madison, USA). Este ágar foi então cultivado em anaerobiose a 37C° por 72 horas. Após este período foi observado o aparecimento de colônias escuras (figura 3), as quais foram isoladas novamente utilizando-se uma alça de levedura de 10 µl em ágar sangue. A cultura foi levada à estufa a uma temperatura de 37C° por 72 horas. O meio novamente apresentou colônias com coloração escura (figura 4), estas em foram isoladas em ágar macconkey (Kasvi, Padova, Itália), chocolate (Kasvi, Padova, Itália) e sangue (Kasvi, Padova, Itália). As placas foram incubadas em anaerobiose a 37C° por 72 horas. Observando-se as placas, observou-se que o crescimento em ágar macconkey (Kasvi, Padova, Itália) se deu de forma mais rápida em comparação com os outros meios de cultivo, com o aparecimento de uma colônia com aspecto enegrecido, a partir dessa colônia foram feitos os testes de bioquimismo, utilizando-se os meios MIO (motilidade, indol e ornitina), citrato, TSI (triplo açúcar com ferro) e LIA (ágar lisina com ferro). Tal teste foi considerado inconclusivo pois não se tratava de uma enterobactéria. Foi também realizada a coloração de Gram dessa colônia, na qual, através de microscopia óptica (figura 5) foram observados bacilos gram-negativos (11).

Figura 3. Indica o aparecimento de colônias escuras no meio ágar sangue suplementado com canamicina a 5% (KanaPlex, Madison, USA)



Figura 4. Novo crescimento de colônias escuras no meio ágar macconkey (Kasvi, Padova, Itália), chocolate (Kasvi, Padova, Itália) e sangue (Kasvi, Padova, Itália)

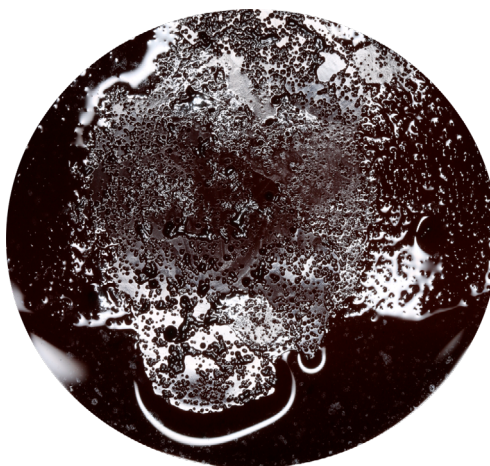
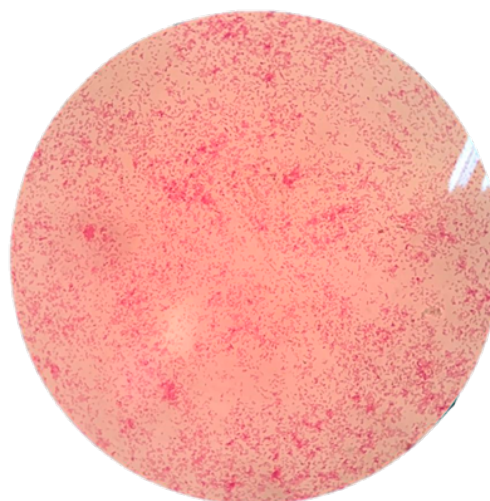


Figura 5. Através da microscopia, observa-se bacilos gram-negativos e após foi realizado a coloração de Gram dessa colônia



Após o resultado da coloração, foi realizada prova da bile, na qual o ágar bile esculina (Kasvi, Padova, Itália) foi utilizado, porém não se observou crescimento neste meio. Foi realizada também a prova da Rifampicina (Newprov, Pinhais, Brasil), na qual obteve-se um halo superior a 12 milímetros, resultado que indicia sensibilidade ao antibiótico. Em contraste, a bactéria apresentou-se resistente ao antibiótico Kanamicina (Newprov, Pinhais, Brasil), com um halo de inibição inferior a 10 milímetros.

Resultados

Frente aos aspectos clínicos observados e o bioquimismo realizado, podemos afirmar se tratar de colônias da bactéria do tipo *Prevotella sp.* Contudo, os testes foram inconclusivos para afirmar se tratar de *Prevotella melaninogênica*.

Discussão

A composição do microbioma oral varia de hábitos alimentares, idade, função hormonal, fluxo salivar até condições imunológicas, higienização e alcoolismo (12). Acredita-se que os componentes dos pigmentos negros são compostos de ferro insolúvel, possivelmente da ação bacteriana do ambiente bucal e o ferro contido na saliva (13). Pode-se dividir as manchas dentárias em duas categorias: Intrínsecas que são associadas a mudanças químicas nos dentes, como a medicação tetraciclina ou defeitos no desenvolvimento dentário; ou extrínsecas que são causadas por depósitos de bactérias cromógenas, alimentos, fumo ou tabaco (14).

Prevotella spp. são agentes pleomórficos, anaeróbios, bacilares gram-negativos (15) ou cocobacilares, e são colonizadores principalmente da mucosa oral e vaginal, sendo agentes de suma importância nas infecções periodontais agudas, abscessos dentários e outras entidades na cavidade oral. Costuma ser um dos anaeróbios mais frequentemente isolados em amostras clínicas de infecções. No laboratório apresenta sensibilidade à penicilina, canamicina, vancomicina e colistina. Apresentam crescimento seletivo em um meio enriquecido com ácidos biliares, onde *Bacteroides* do grupo *fragilis* conseguem se reproduzir em colônias, porém o oposto ocorre com *Prevotella spp.* Sua cor costuma ser de cor-de-tijolo após exposta à luz ultravioleta (UV) a 360nm. (16). As suas colônias quando isoladas em ágar sangue apresentam aspecto translúcido, opaco, cinzento, castanho claro ou preto. (6)

As manchas negras geralmente estão associadas às bactérias *Prevotella melaninogênica* e *Actinomyces spp* (17) porém, em nosso estudo não foram encontrados *Actinomyces* nos isolados. O desfecho pode ter ocorrido pelo fato da *Prevotella spp.* estar em maior concentração nas amostras em comparação com *Actinomyces spp.*

Os achados do nosso estudo confirmam que as bactérias presentes nas manchas negras encontradas no paciente se trata de *Prevotella spp.*. Levando-se em conta o aspecto enegrecido do biofilme dental e das colônias, associado aos testes microbiológicos realizados, a sugestão diagnóstica é que se trate de *Prevotella melaninogênica*. Entretanto, para a confirmação, é necessária utilização da prova de luz UV (ultra-violeta) ou testes biomoleculares para a confirmação e veredito final.

As manchas negras são apresentadas com uma linha contínua ou não, localizadas ao longo da margem gengival, podendo ser em pontos escuros ou formando uma linha paralela à margem, onde pode atingir no mínimo dois dentes. As pigmentações negras também podem estar impregnadas em sulcos, fóssulas e fissuras, porém são locais de mais difícil remoção, (10), somente o uso de escova de dentes e dentífrício, não são capazes de eliminar a mancha negra, necessitando a intervenção profissional com raspagem e polimento com substâncias abrasivas como pastas profiláticas ou o uso de jato de bicarbonato de sódio (18). Para a devida remoção das manchas de bactéria cromogênica é comum a utilização de escova Robson, pasta e Pedra Pomes, mantendo o acompanhamento periódico após sua remoção, pois nessa fase é comum a ocorrência de recidiva (19).

A literatura demonstra que o paciente que tem maiores áreas afetadas pelos pigmentos negros, tem uma menor a probabilidade de desenvolvimento da doença cárie, devido aos altos níveis de cálcio e fosfato em suas placas bacterianas e pela associação da mineralização implicando um pH mais estável, ocorrendo um aumento na capacidade tampão e a dissolução do esmalte reduzida (12, 13, 17, 19).

Conclusão

Através das características clínicas associadas ao bioquimismo empregado nos testes, podemos concluir que a bactéria que está associada as manchas negras presentes no paciente é do gênero *prevotella spp.*

Referências

- 1 Xu H, Dongari-Bagtzoglou A. Shaping the oral mycobiota: interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. *Current opinion in microbiol* 2015; 26:65-70.
- 2 Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS. Dental discoloration: an overview. *J Esthet and Rest Dent* 1999;11;291-310.
- 3 Siqueira JF, Rôças IN. The oral microbiota in health and disease: an overview of molecular findings. In: *Oral Biology* 2017; Humana Press, New York 127-138.
- 4 Germano VE, Xavier CMR, Jales MMS, Albuquerque TVG, Lima ELF, Ribeiro LH; Microrganismos Habitantes Da Cavidade Oral E Sua Relação Com Patologias Orais E Sistêmicas: Revisão De Literatura. *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança* 2018; 16:91-99
- 5 Liu X. Alterations of gastric mucosal microbiota across different stomach microhabitats in a cohort of 276 patients with gastric cancer; *E Bio Medicine* 2019; 40: 336-348.
- 6 Penido CVSR, Moura AL, Macedo MP, Penindo SMMO. Manchas extrínsecas negras–relato de caso clínico. *Revista da Faculdade de Odontologia de Lins* 2013; 23:59-64.
- 7 Reid JS, Beeley JA, Macdonald DG. Investigations into black extrinsic tooth stain. *J Dental Res* 1977;56:895-899
- 8 Gasparetto A, Conrado CA, Maciel SM, Miyamoto EY, Chicarelli M, Zanata RL. Prevalence of black tooth stains and dental caries in Brazilian schoolchildren; *Braz Dent J* 2003;14:157-161.
- 9 Rached FO, Guimarães MS, Josgrilberg ÉB, Bassi JC, Hebling J. Bactérias cromogênicas: revisão de literatura e casos clínicos. *Revista de Odontologia da UNESP* 2013;34:0-0.
- 10 Cabrita GM. Abordagem terapêutica de dentes permanentes com manchas e pigmentações em odontopediatria 2012; Tese de Doutorado.
- 11 Moyes RB, Reynolds J, Breakwell DP. Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr Protoc Microbiol.* 2009;Appendix 3:Appendix 3C.
- 12 Cardoso VM. O microbioma humano 2015; Tese de Doutorado.
- 13 Matínez TM. Manchas dentárias negras em escolares: prevalência e fatores associados 2012.
- 14 Igreja G, Miotto MHMB, Baptista G. Estudo de fatores responsáveis por manchas dentárias extrínsecas. *Rev Bras Pesq Saúde/Braz J Health Res* 2015; 1:2.
- 15 Alonso G, Acevedo A. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta Odontol Venez* 2009; 47:19.
- 16 Alves J, Peres S, Gonçalves E, Mansinho K. Bactérias anaeróbias com relevância clínica. Entidades infecciosas associadas, manifestações clínicas e considerações terapêuticas. *RPDI* 2017; 13:3.
- 17 Pinto CCF. Manchas negras dentárias: prevalência e associação com cárie dentária Universidade Federal de Pelotas. 2011; Dissertação de Mestrado.

- 18 Shah HN, Collins DM. Prevotella, a new genus to include Bacteroides melaninogenicus and related species formerly classified in the genus Bacteroides. Int J Syst Evolutionary Microbiol 1990; 40:205-208.
- 19 Gislyane G, Campos A, Queiroz N, Alves I, Vasconcelos S, Martins L. Mancha Dental Extrínseca: Revisão De Literatua. Jornada Odontológica dos Acadêmicos da Católica 2017; 2:1.